

<令和3年度助成>

微生物の迅速検査を可能にする 人工シデロフォア修飾蛍光材料の開発

猪股 智彦

(名古屋工業大学大学院 工学研究科工学専攻 生命・応用化学系プログラム)

緒言

近年、HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) 導入により、微生物の迅速な検出に対するニーズが高まっている。微生物を高感度に検出するためには微生物自身、あるいはPCR法によるDNA等の増殖が必要であり、検出結果が出るまでに時間がかかる。シデロフォアとは微生物が必須金属イオンである鉄イオンを捕捉し細胞内に取り込むために産出するキレート分子である。微生物から放出されたシデロフォアは環境中に存在する鉄イオンと選択的に結合して複合体を形成する。形成された複合体は微生物の細胞膜上にあるレセプターと呼ばれる膜タンパク質で認識され、細胞内へと取り込まれる。人工シデロフォアは天然のシデロフォアの機能を模倣した人工的に合成された化合物であるが、我々は人工シデロフォアを利用した微生物の選択的検出技

術の開発に取り組んでいる¹⁻³⁾。微生物がレセプターで認識可能な人工シデロフォアの構造が異なるため、人工シデロフォアの構造をチューニングすることで選択的に微生物を検出可能となる。

本研究では、図1に示したように人工シデロフォア分子に蛍光を発する材料を結合することで、培養操作を必要としない、視覚的に微生物を選択的に検出可能な技術の開発を目指す。人工シデロフォアの構造の違いにより、それを取り込むことのできる微生物が異なるため、微生物を選択的に検出することが可能な技術となる。本報告書では、人工シデロフォアおよびその鉄錯体の合成と諸性質の測定、蛍光材料と結合した人工シデロフォアおよびその鉄錯体の合成とその蛍光測定、蛍光材料と結合した人工シデロフォア鉄錯体を用いた微生物の培養実験および蛍光材料による可視化について報告する。

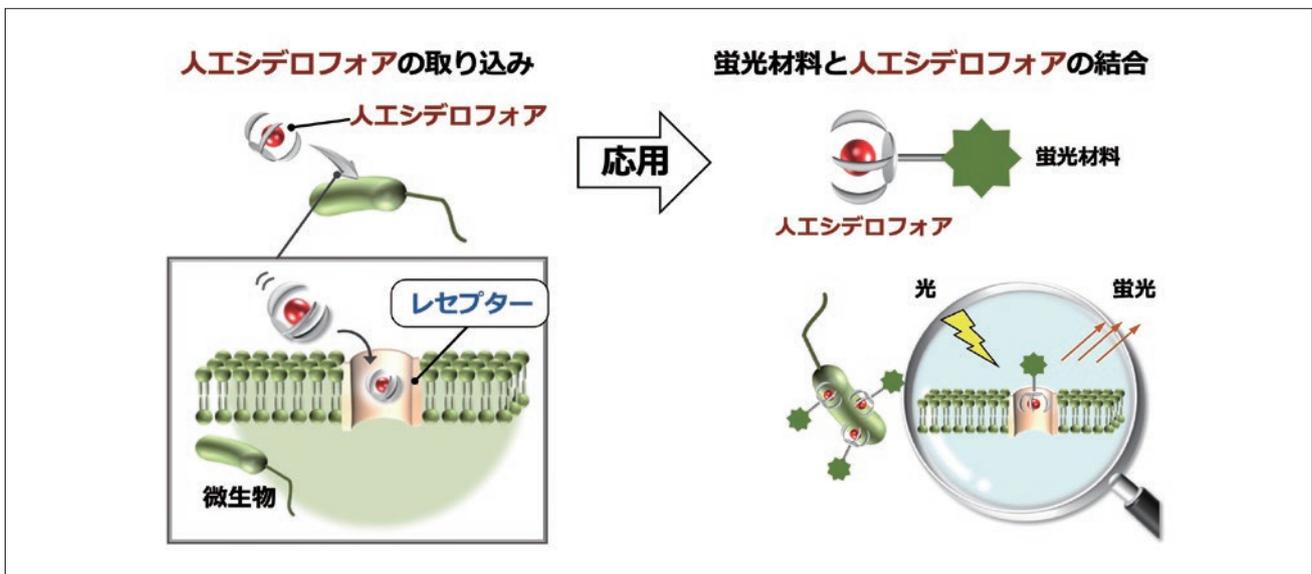


図1 蛍光材料を結合した人工シデロフォア鉄錯体による微生物の検出

結果と考察

・人工シデロフォアおよびそれらの鉄錯体の合成

本研究では微生物に選択的に取り込まれる人工シデロフォア鉄錯体として図2に示した末端にNH₂-基を有する4種類の人工シデロフォアおよびそれらの鉄錯体を合成した⁴⁾。このうちL_{C2H1} およびL_{C1H2} は既報^{1,2)}であるL_{C3} およびL_{H3} の合成法をもとに新

規に合成したハイブリッド型人工シデロフォアである。各人工シデロフォアはFT-IR、¹HNMR、およびESI-MS、それらの鉄錯体はUV/vis スペクトルおよび元素分析によって同定された。微生物 (*E. coli*, *B. subtilis*, *M. flavescens*, *P. putida*, *R. rhodochrous* など) を用いて合成された人工シデロフォア鉄錯体の取込能を評価し、これらの人工シデロフォアが選択的に微生物に取り込まれることを確認した。

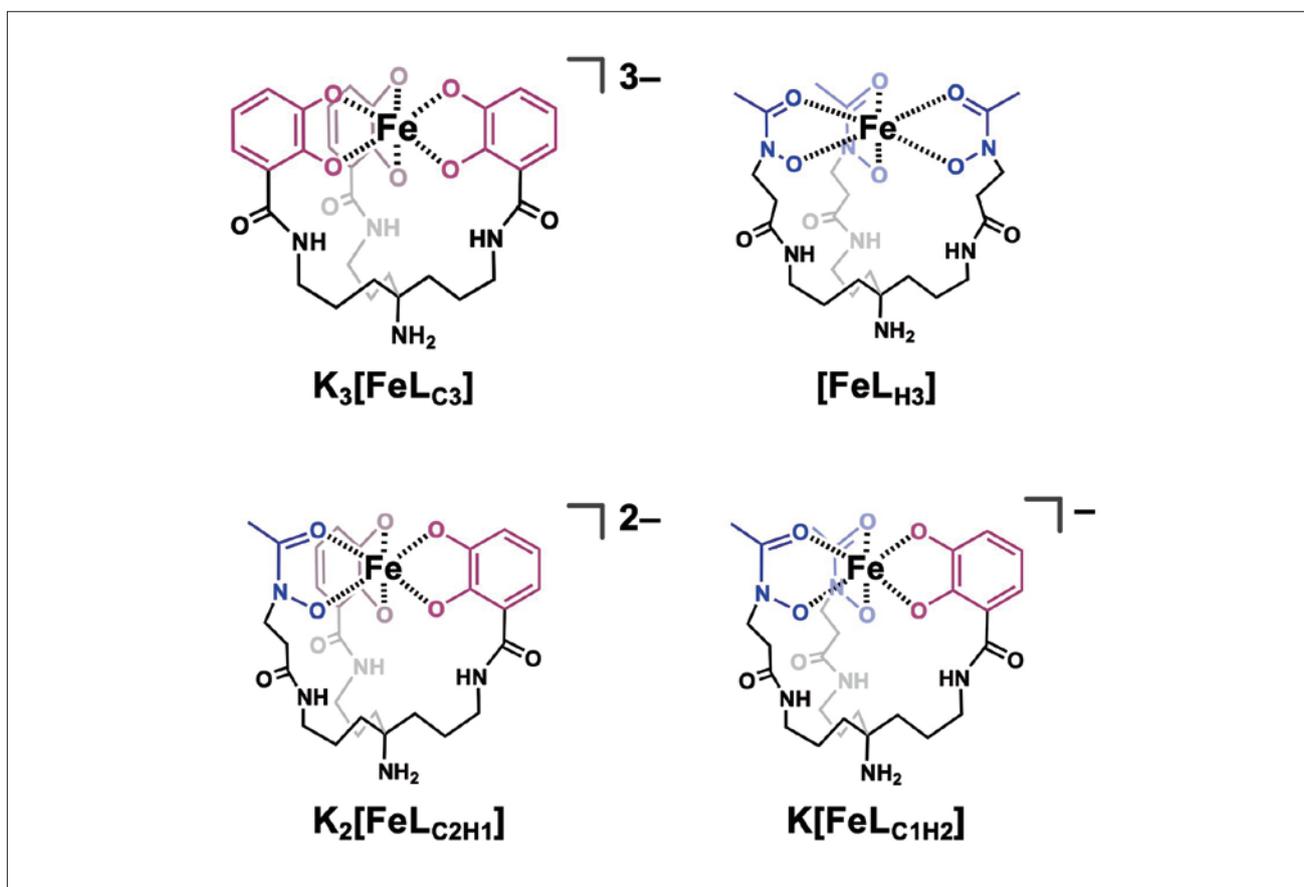


図2 本研究で合成した人工シデロフォア鉄錯体の構造

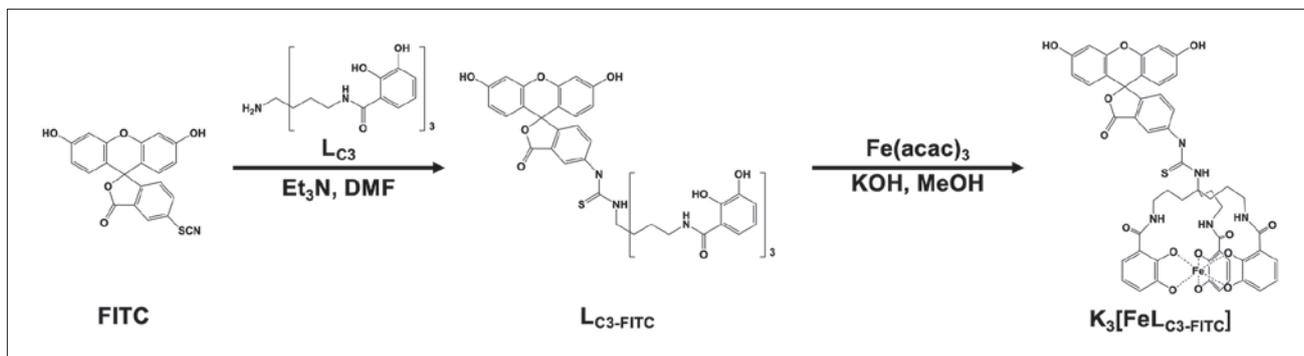


図3 蛍光材料を結合した人工シデロフォア分子およびその鉄錯体の合成法

・ 蛍光材料が結合した人工シデロフォアおよびその鉄錯体の合成

上記で合成された人工シデロフォアのうち、一般的な微生物である *E. coli* にもっとも選択的に取り込まれる $K_3[FeL_{C_3}]$ に一般的蛍光色素であるフルオレセイン (FITC) を結合した人工シデロフォア (L_{C_3-FITC}) および人工シデロフォア錯体 ($K_3[FeL_{C_3-FITC}]$) を図 3 に示した方法により新規に合成した。 L_{C_3-FITC} は FT-IR および 1H NMR、 $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ は FT-IR および UV/vis スペクトルにより同定した。 L_{C_3} と FITC との結合は L_{C_3} の末端にある NH_2 -基と FITC の NCS-基との縮合反応により行った。我々が合成した人工シデロフォアは各種材料の表面などに結合するためにいずれも NH_2 -基を末端に導入しており、今回の合成により蛍光材料への結合も比較的容易に行えることが判明した。また L_{C_3} に対して同程度の大きさを有する FITC を導入できたことから、立体障害などによる合成への影響もほとんど観測されず、 NH_2 -基に結合する官能基であればどのような蛍光材料にも導入可能であることが示唆された。

・ $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ の UV/vis および蛍光スペクトル

図 4a に合成された L_{C_3-FITC} および $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ の UV/vis スペクトルを示した。 L_{C_3-FITC} のスペクトルに比べて $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ のスペクトルでは全体的に吸収の上昇が見られたが、これは人工シデロフォア部位が鉄イオンと錯形成をしたことにより新たに観測さ

れた電荷移動吸収 ($K_3[FeL_{C_3}]$ では 499 nm に観測²⁾ が overlap したためと考えられる。この結果から鉄イオンとの錯形成反応は問題なく進行しているものと判断できる。また両者の差スペクトルでは、 $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ 由来の電荷移動吸収がほぼ同じ位置に観測されたため、FITC の結合による錯体の構造への影響はほとんどないことが示唆された。

図 4b に励起波長 490 nm で観測された L_{C_3-FITC} および $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ の蛍光スペクトルを示した。 L_{C_3-FITC} の蛍光スペクトル強度に比較して、錯形成反応により鉄イオンが導入された $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ では、その蛍光スペクトル強度は大きく減少することが判明した。これは配位した鉄イオンによる消光過程が存在するためと考えられる。図 4c に示したのは濃度 0.02 M に調整した L_{C_3-FITC} および $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ の水溶液の写真であり、この濃度では鉄イオンが導入された $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ による蛍光が減衰していることがわかる。このような鉄イオンの導入による消光を防ぐためには、 L_{C_3} と FITC の間の距離を離すためにリンカー分子の導入などが必要と考えられる。

・ $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ による *E. coli* の培養実験

濁度測定による $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ の *E. coli* への取込実験を行った。図 5 に鉄制限培地中で培養された *E. coli* の生長曲線を示した。何も加えない (鉄イオン源がない) 場合は *E. coli* の増殖は見られなかったが、 $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ を加えた場合は、蛍光材料を結合して

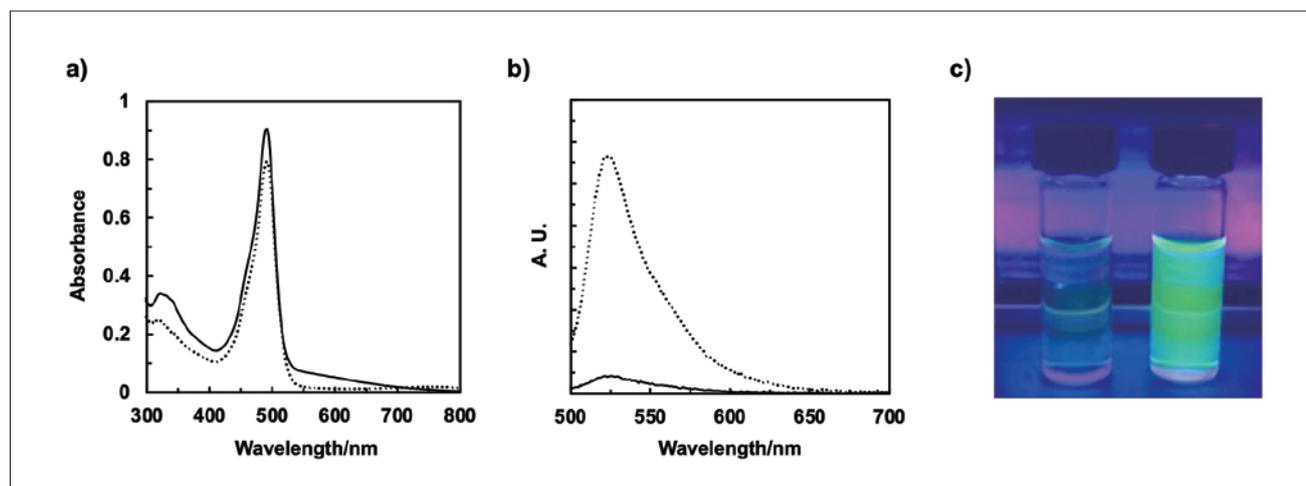


図 4 L_{C_3-FITC} (点線) および $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ (実線) の a) UV/vis 吸収スペクトル、b) 蛍光スペクトル、c) UV ランプ照射時の写真 (サンプル濃度: 0.02 mM phosphate buffer (pH 7.0)、励起波長 490 nm)

いない人工シデロフォア鉄錯体である $K_3[FeL_{C_3}]$ と同程度の *E. coli* の増殖が観測された。これは加えた $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ が鉄イオン源として *E. coli* 内部へ取り込まれたことで増殖したものと考えられる。これは当初の目的どおり、蛍光材料を結合した人工シデロフォア鉄錯体が微生物の細胞膜上のレセプタータンパク質によって認識され微生物細胞内に取り込まれていることを示している。現状では先にも述べたとおり $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ は鉄イオンの導入による消光過程が存在し、十分な発光強度が出ていない。そのため現時点では $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ により *E. coli* の蛍光によるラベル化ができていないかを判断することはできなかった。今後リンカー分子の導入による蛍光強度減衰の抑制や他の蛍光材料（蛍光を発する半導体微粒子や GFP タンパク質など）と結合した人工シデロフォア分子の開発を進める予定である。

結 言

本研究では、その構造の違いにより選択的に微生物に取り込まれる人工シデロフォア鉄錯体に蛍光材料を結合し、視覚的に微生物の検出などが行える材料の開発を行った。そのため4種類の人工シデロフォア分子を設計・合成し、それらの鉄錯体の複数の微生物に対する取込能力を検討した。*E. coli* に対して選択的な取込能力を示す $K_3[FeL_{C_3}]$ に対して蛍光色素である FITC を結合した新規人工シデロフォアである L_{C_3-FITC} およびその鉄錯体である $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ を設計・合成し、その蛍光特性について評価した。また実際に *E. coli* を用いた培養実験を行い、 $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ が *E. coli* 細胞内へ取り込まれることを確認した。

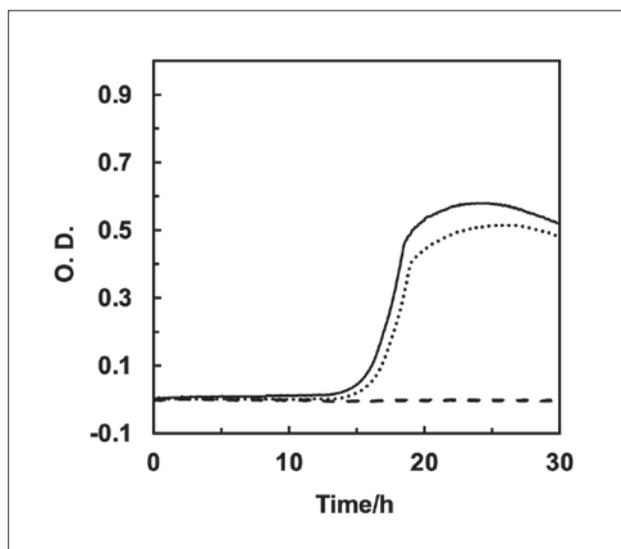


図5 鉄イオン源なし（破線）、 $K_3[FeL_{C_3}]$ （点線）および $K_3[FeL_{C_3-FITC}]$ （実線）添加時の *E. coli* の生長曲線

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) T. Inomata, H. Eguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda, *Langmuir*, 2012, 28, 1611-1617.
- 2) T. Inomata, H. Tanabashi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda, *Dalton Trans.*, 2013, 42, 16043-16048.
- 3) T. Inomata, T. Murase, H. Ido, T. Ozawa, H. Masuda, *Chem. Lett.*, 2014, 43, 1146-1148.
- 4) T. Inomata, S. Endo, H. Ido, R. Mori, Y. Iwai, T. Ozawa, H. Masuda, *Inorg. Chem.*, 2023, 62, 16362-16377.

Development of fluorescence material-modified artificial siderophores for rapid detection of microorganisms

Tomohiko INOMATA

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

The rapid and high-sensitivity detection of microorganisms is one of the critical problems for food safety and public health. We have focused on the iron uptake system by microorganisms using siderophore molecules to develop new rapid, sensitive, and selective microbial detection methods. Siderophores are small Fe ion chelating molecules for iron uptake. The siderophores form stable complexes with Fe ions, while the receptor proteins on the surface of microorganisms recognize the complexes, which permeate into the interior of the cells. Artificial siderophores are functional model compounds for native siderophores. We have developed techniques for the selective adsorption of microorganisms using artificial siderophore-Fe complex-modified substrates. In this study, we succeeded in the synthesis of an artificial siderophore connected to a fluorescent material ($L_{C3-FITC}$) and its Fe ion complex ($[FeL_{C3-FITC}]^{3-}$). These molecules emitted fluorescence in an aqueous solution. Biological curve measurement using *E. coli* indicated the permeation of $[FeL_{C3-FITC}]^{3-}$ into the *E. coli* cell interior. This result indicates that $[FeL_{C3-FITC}]^{3-}$ permeates into *E. coli*, and possesses a good ability for the selective detection of microorganisms using fluorescence.